



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TESIS

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS PARA
LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Prosopis laevigata* (HUMB. &
WILLD.) M. C. JOHNST.**

Para obtener el título de

Licenciado en Biología

PRESENTA

Gerardo López Calzada

Directora

Dra. Dulce María Galván Hernández

Comité tutorial

Dra. Maritza López Herrera

Dr. Arturo Sánchez González

Dra. Ana Paola Martínez Falcón

Pachuca de Soto, Hidalgo., diciembre, 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 5 de diciembre de 2023

Número de control: ICBI-D/1885/2023
Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Biología **Gerardo López Calzada**, quien presenta el trabajo de titulación **“Evaluación de tratamientos pre-germinativos para la propagación *in vitro* de *Prosopis laevigata* (Humb. & Willd) M. C. Johnst”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dra. Maritza López Herrera

Secretario: Dr. Arturo Sánchez González

Vocal: Dra. Dulce María Galván Hernández

Suplente: Dra. Ana Paola Martínez Falcón

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente,
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI



OAAS/YCC



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras. Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

A mis padres, Laura Calzada Rosales y Pablo López Navarrete por ser mi centro en este mundo y los pilares más importantes que sostienen mi vida.

A mis hermanos por el gran apoyo y comprensión brindada en este recorrido.

A mis sobrinos por ser la felicidad de vida en momentos difíciles.

A mis amistades que han formado parte importante en cada etapa de mi vida, por estar para mí cuando más los he necesitado y sobre todo por no dejarme caer.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la Carrera de Biología por brindarme sus conocimientos, su tiempo y su comprensión para que el día de hoy sea una muestra más del querer es poder.

A mis sinodales:

Dra. Dulce María Galván Hernández, infinitamente gracias por todo el apoyo brindado a este proyecto, gracias por su paciencia, por sus conocimientos extraordinarios, por su entrega incondicional como docente, pero sobre todo gracias por su amistad, por apoyarme en momentos difíciles de mi vida, mismos que en ocasiones estaban por derribarme, no acabaría de enunciar lo importante que fue en este gran proceso, del cual estamos viendo frutos. Estaré eternamente agradecido por caminar conmigo en mis locuras y nunca soltarme.

Dra. Maritza López Herrera, gracias por sus clases impartidas a este simple mortal, su conocimiento es grande como su profesionalismo, gracias por formar parte de este proyecto y darme los mejores errores porque de ellos estoy aprendiendo.

Dr. Arturo Sánchez González, gracias por sus enseñanzas dentro y fuera del aula, un reconocimiento por su gran trayectoria y un honor tenerlo como parte de mis sinodales, del cual estaré agradecido.

Dra. Ana Paola Martínez Falcón, gracias por sus valiosas observaciones y por el tiempo que se tomó en leer este proyecto, agradezco que haya aceptado ser parte de mis sinodales y estoy seguro que cada observación será siempre enriquecedora.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2. <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. & Willd.) M. C. Johnst.	4
2.1 Clasificación taxonómica	4
2.2 Descripción botánica.....	4
2.3 Distribución geográfica	5
2.4 Usos	7
2.6 Problemáticas poblacionales.....	8
2.7 Latencia de <i>P. laevigata</i> y tratamientos pre-germinativos.....	8
2.8 Estrategias de propagación	10
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo General:	14
4.2 Objetivos específicos:.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODO	15
5.1 Área de estudio.....	15
5.2 Recolección de vainas y extracción de semillas.....	15
5.3 Almacenamiento de semillas	15
5.4 Prueba de viabilidad	16
5.5 Tratamientos pre-germinativos	16
5.6 Evaluación de un protocolo de desinfección de las semillas.....	17
5.7 Preparación de medio de cultivo y siembra.....	18
5.8 Condiciones de incubación	18
5.9 Análisis de datos	18
6. RESULTADOS	19
6.1 Prueba de viabilidad	19
6.2 Método de desinfección.....	19
6.3 Tratamientos pre-germinativos	20
7. DISCUSIÓN	25
7.1 Viabilidad de las semillas	25
7.2 Protocolo de desinfección	26
7.3 Tratamientos pre-germinativos	27
8. CONCLUSIONES.....	30
9. BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Prosopis laevigata</i> (Foto: López-Calzada).....	4
Figura 2. Estructuras vegetativas de <i>Prosopis laevigata</i> . A) Inflorescencia, B) Estructura foliar, C) Frutos, D) Corteza (López-Calzada).....	6
Figura 3. Distribución natural de <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. & Willd.) M. C. Johnst. en México (Tomado de Palacios <i>et al.</i> , 2016).....	7
Figura 4. Comparación entre tratamientos de escarificación mecánica en semillas de <i>P. laevigata</i> . A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación.	21
Figura 5. Comparación entre tratamientos pre-germinativos físicos en semillas de <i>P. laevigata</i> . A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación.	22
Figura 6. Comparación entre tratamientos pre-germinativos químicos en semillas de mezquite. A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación.	23
Figura 7. Comparación entre tratamientos pre-germinativos del tipo mecánico, físico y manual. A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación.	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Trabajos realizados en la última década sobre las estrategias de propagación en invernadero e <i>in vitro</i> en <i>Prosopis laevigata</i>	11
Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión sobre el porcentaje de semillas germinadas y contaminadas en la propagación <i>in vitro</i> de <i>Prosopis laevigata</i>	20

RESUMEN

Prosopis laevigata (Humb. & Willd.) M. C. Johnst. es una especie arbórea de ambientes áridos y semiáridos con amplia distribución en el norte y centro de la República Mexicana. Establece relaciones simbióticas con microorganismos capaces de fijar de nitrógeno atmosférico al suelo, mejorando su fertilidad, promoviendo el crecimiento de otras especies con las que coexisten, y previniendo la erosión por su alta capacidad de retención. De igual forma, es un recurso importante para habitantes de regiones semidesérticas, es usado como material para la elaboración de objetos domésticos y como alternativa de combustible; sin embargo, en México las poblaciones naturales de *P. laevigata* han disminuido considerablemente, por lo cual es importante realizar trabajos de propagación con esta especie. La propagación de *P. laevigata* es a través de semillas, sin embargo, estas presentan latencia física, lo cual disminuye su germinación. Es por esto que, el objetivo de este trabajo fue evaluar ocho diferentes tratamientos de escarificación (mecánicos, físicos y químicos) para aumentar la germinación *in vitro* de la especie. Se evaluó la viabilidad de un lote de semillas de *P. laevigata* en dos tiempos diferentes (febrero y junio de 2021) recolectado en San Juan Zitlaltepec, Zumpango, Estado de México. Se evaluaron tres tratamientos pre-germinativos: para el tratamiento mecánico, se utilizó una lija de agua del número 100 y una licuadora doméstica; para el tratamiento físico, se requirió de agua a cuatro temperaturas diferentes con tiempos específicos de inversión de las semillas (80°C x 10min; 80°C x 5 min seguido de agua a 10°C x 5 min y 70°C hasta descender a 25°C), y para el tratamiento químico, se requirió de ácido sulfúrico H₂SO₄ al 98%, acetona al 100 % y vinagre al 5%. Las semillas se sembraron en frascos con medio MS, cinco semillas por unidad experimental, cada condición contenía nueve repeticiones. Se evaluaron distintas concentraciones de cloro (1, 2 y 5%) a diferentes tiempos de inmersión (10, 15 y 20 minutos) para disminuir la contaminación en el medio de cultivo. La viabilidad de las semillas se redujo un 28.6% en un periodo de cuatro meses, el tratamiento de escarificación mecánica, con la condición de licuadora, es el de mayor efectividad (50.37 ± 27.38%). Se observó que utilizar cloro al 5% por 20 minutos disminuye la contaminación en los medios de cultivo en un 92%, pero al usarlo en mayor concentración y mayor tiempo de exposición, se reduce la germinación de las semillas. Es necesario evaluar otros tratamientos que incrementen la respuesta en las semillas, además, se requiere almacenar en forma adecuada las semillas para mantener su viabilidad y reducir la posterior contaminación. De igual manera, se requiere valorar productos con acción fungicida y bactericida que ayuden a mitigar el problema de contaminación, para no utilizar concentraciones altas de cloro, que afectan la respuesta germinativa de las semillas.

1. INTRODUCCIÓN

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las espermatofitas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen, siendo uno de los elementos más eficaces para su dispersión, ocupando de esta manera un papel trascendental en la historia evolutiva de las plantas vasculares (Doria, 2010; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

Por tal motivo, es de interés científico-práctico el desarrollo de trabajos que evalúen la germinación de las semillas, tomando en cuenta aspectos ecofisiológicos (Doria, 2010; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013), con la finalidad de mejorar la productividad de los cultivos, así como, propagar algunas especies con fines de reforestación y restauración ecológica (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

En este sentido, *Prosopis laevigata* es una de las especies arbóreas o arbustivas que más se utiliza para restaurar ecosistemas semiáridos, debido a que tienen una relación simbiótica con microorganismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico, propiciando su aportación al suelo; promoviendo el crecimiento de otras especies que conforman los matorrales, lo cual previene la erosión del mismo (Ríos-Saucedo *et al.*, 2012; Quiñones *et al.*, 2013; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014; Palacios *et al.*, 2016).

Además de ser fuente de alimento y refugio para la fauna silvestre, el mezquite produce diversos bienes para el ser humano, ya que su madera es usada como combustible y para la construcción de cercas; sus vainas fungen como forraje y como alimento para el hombre; produce resina que tiene uso en la fabricación de pegamentos, barnices; mientras que sus flores son importantes en la producción de miel (Rodríguez *et al.*, 2014).

Sin embargo, actualmente en nuestro país las poblaciones naturales de esta especie han disminuido considerablemente debido a la fragmentación, perturbación de los hábitats donde se distribuye y por desmedida explotación; estos hechos, aunado a la latencia física que presentan las semillas, ha ocasionado la casi nula regeneración natural de los mezquiales (Juárez *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2005; Palacios *et al.*, 2016).

La latencia es el estado en que se encuentra una semilla viable sin que germine, de esta forma se inactivan diversos procesos metabólicos evitando que se desarrolle y crezca la plántula. No obstante, la latencia cumple también la función de prevenir la germinación cuando las condiciones ambientales no son favorables, es decir, cuando la probabilidad de crecimiento y establecimiento de las plántulas es baja (Juárez *et al.*, 2001; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

Las semillas de *P. laevigata* son ortodoxas y presentan latencia física, esto se debe a su cubierta (testa) dura e impermeable que impide el paso del agua, inhibiendo en parte la germinación, si las semillas al caer al suelo no son consumidas por animales permanecen en latencia hasta que el endocarpio sea abierto por un factor escarificativo (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2022). Este hecho hace que la testa se convierta en un problema al pretender un manejo de la semilla para fines reproductivos (Juárez *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2005; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Villarreal *et al.*, 2013).

Para enfrentar los problemas de latencia en las semillas, se han desarrollado diversas estrategias con tratamientos pre-germinativos que han permitido obtener una germinación rápida,

completa y uniforme (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Villarreal *et al.*, 2013). Entre estas técnicas se encuentran los tratamientos de escarificación que están encaminados a facilitar la germinación y con ello conseguir una mejor producción de la especie (Juárez *et al.*, 2001; Quiñones *et al.*, 2013; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Villarreal *et al.*, 2013). Las evidencias prácticas que emplean este tipo de tratamientos revelan perspectivas exitosas a partir de la propagación tanto en viveros como *in vitro*, garantizado la posibilidad de reintroducir ejemplares en zonas perturbadas, ayudando de esta forma a la restauración ecológica para incrementar la densidad de los mezquiales silvestres (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Minchala-Patiño *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

2. *Prosopis laevigata* (Humb. & Willd.) M. C. Johnst.

2.1 Clasificación taxonómica

Nombre común: Mezquite

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledoneas) Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Prosopis*



Figura 1. *Prosopis laevigata* (autoría propia).

2.2 Descripción botánica

A *P. laevigata* se le conoce con el nombre común de mezquite blanco, es un árbol que puede tener una altura máxima de 15 metros, el diámetro de su tronco oscila entre los 30 a 60 cm, pero en algunos casos puede llegar a 1 metro; la corteza del mismo es gruesa y de color café-negrusco, algo fisurada (Figura 2D); copa más ancha que alta; ramas glabras o pilosas, armadas de espinas estipulares de 1 a 4 cm de largo; yemas de 2 a 3 mm de largo, cubiertas de escamas

lanceoladas verdes, un poco pubescentes (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014). Sus raíces pueden alcanzar más de 50 m de profundidad (Rosales *et al.*, 2011).

Sus hojas son bi-pinnadas, aunque pueden presentarse con 1 a 3 pares de pinnas; las estructuras foliares pueden medir de 2.5 a 12 cm de largo y contener entre 20 y 40 pares de folíolos cada una; estos son glabros, lineares, oblongos, miden de 5 a 10 mm de largo y son de 2 a 7 veces más largos que anchos; su color es verde pálido a grisáceo y en la parte inferior tiene una fuerte nervadura pinnada (Palacios, 2006; Rosales *et al.*, 2011; Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014) (Figura 2B).

Presentan inflorescencias dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo; flores bisexuales blanco-amarillentas, actinomorfas, con 5 sépalos y 10 estambres (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014) (Figura 2A).

El fruto es una vaina linear, algo falcada, de 7 a 20 cm de largo por 8 a 20 mm de ancho y 6 a 8 mm de espesor; es de color café-amarillento, a veces rojizo, algo constreñida entre las semillas; éstas son oblongas, comprimidas, de 8 a 10 mm de largo (Palacios, 2006; Rosales *et al.*, 2011; Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014) (Figura 2C). Las semillas están dispuestas de manera longitudinal dentro de la vaina, que puede contener entre 14 y 18 semillas por fruto (Rosales *et al.*, 2011).

2.3 Distribución geográfica

Prosopis laevigata (Humb. & Willd.) M. C. Johnst. es una especie arbórea con amplia distribución en zonas áridas y semiáridas del norte y centro de la República Mexicana, encontrándose en casi todo el territorio mexicano, particularmente se localiza en los estados de Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Nuevo León, Durango, Coahuila, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, Guanajuato, Morelos, Querétaro, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; por el lado del Golfo de México, se ha localizado en Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo (Palacios, 2006; Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014; Palacios *et al.*, 2016) (Figura 3). La amplia distribución geográfica de *P. laevigata* indica que es una especie capaz de establecerse en zonas con temperatura y humedad variables (Rzedowski, 1988).



Figura 2. Estructuras vegetativas de *Prosopis laevigata*. A) Inflorescencia, B) Estructura foliar, C) Frutos, D) Corteza (autoría propia).

Esta especie forma parte de matorrales xerófilos y su amplia plasticidad fenotípica le permite sobrevivir en zonas con temperatura media que va de 20 a 29° C y precipitación pluvial que oscila entre 350 y 1200 mm anuales; se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2200 m de altitud (Palacios, 2006; Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014; Rzedowski, 1988).

P. laevigata se desarrolla en suelos arenosos, profundos y con buen drenaje, aunque también puede crecer en suelos arcillosos (Rosales *et al.*, 2011). La amplitud y profundidad de su sistema radicular, así como la reducción de su sistema foliar son algunas adaptaciones que han desarrollado los mezquites en ambientes áridos. De esta manera, la forma de vida arbórea indica disponibilidad de agua subterránea a poca profundidad, mientras que la forma arbustiva se relaciona con un manto freático profundo (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014).

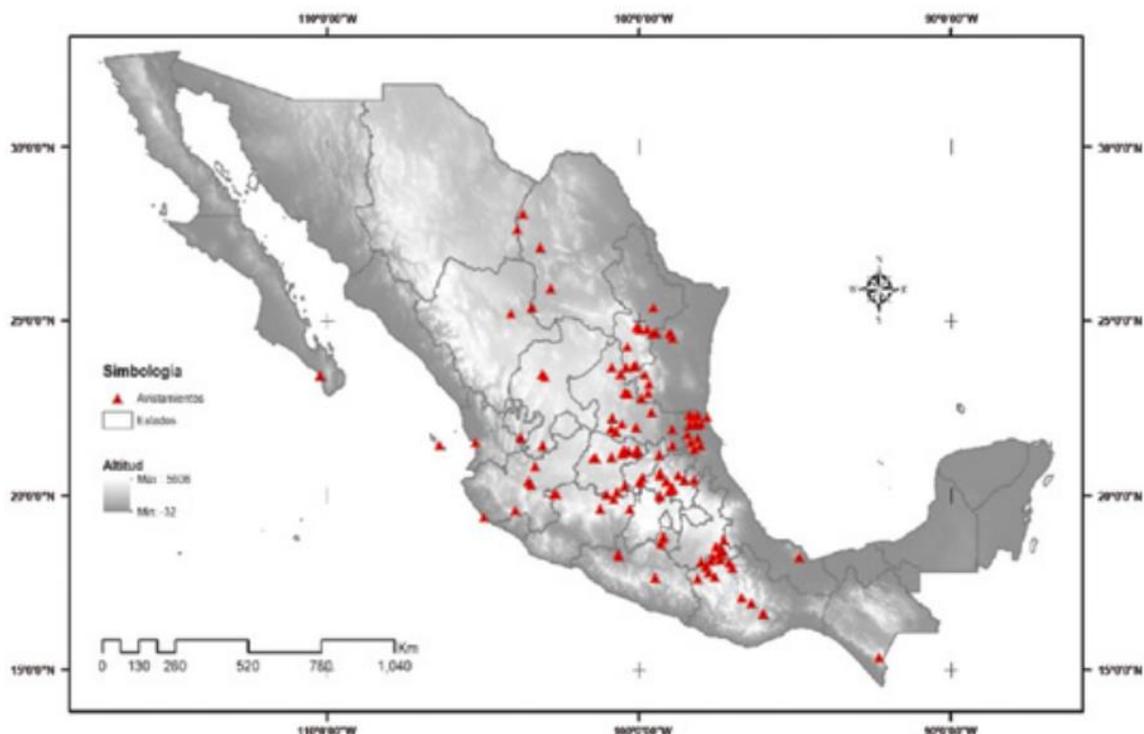


Figura 3. Distribución natural de *Prosopis laevigata* (Humb. & Willd.) M. C. Johnst. en México (Tomado de Palacios *et al.*, 2016).

2.4 Usos

El mezquite ha sido uno de los principales recursos naturales explotados por los habitantes de las regiones áridas, quienes obtienen de esta planta múltiples beneficios, entre los que destacan la utilización de leña como fuente de energía y producción de carbón; elaboración de postes para cercos, tablas y tablones, así como la construcción de muebles y artesanías. A partir de sus frutos y hojas se obtiene alimento para el ganado, las flores se han aprovechado por sus propiedades medicinales, además de fines apícolas y comerciales por la goma que exuda (Prieto *et al.*, 2013; Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014; Palacios *et al.*, 2016; Pérez-Serrano *et al.*, 2021).

2.5 Importancia ecológica

Prosopis laevigata es una especie de importancia ecológica en las zonas donde abunda, ya que tiene raíces profundas que participan en el control de la erosión del suelo. Además, al ser una leguminosa, ayuda a nitrogenar el suelo por medio de las micorrizas asociadas a sus raíces, optimizando la fertilidad del mismo y favoreciendo la nutrición de las plantas circundantes, propiciando de esta forma refugios para fauna silvestre (Prieto *et al.*, 2013; Palacios *et al.*, 2016; Bernal-Ramírez *et al.*, 2019).

De igual forma, se cree que *P. laevigata* tiene cierta importancia como indicador, ya que esta especie se asocia con la presencia de mantos freáticos, lo que indica dónde se podrían perforar pozos para uso público (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

2.6 Problemáticas poblacionales

Actualmente, se ha documentado en varias zonas de México la severa explotación del mezquite, debido a su inadecuado aprovechamiento, sobre todo, para leña, carbón y en algunos casos, por el cambio de uso del suelo para establecer campos agrícolas y zonas de urbanización, por lo cual, la densidad poblacional de la especie ha disminuido considerablemente. Dicha problemática es notoria en estados como: Coahuila, Durango y Chihuahua, en donde la tasa aproximada de pérdida anual en hectáreas es de 5,054, 500 y 340, respectivamente; por ello, es necesario fomentar su manejo sustentable, que se traduzca en la generación de beneficios económicos para los poseedores del recurso, sin deteriorar o desaparecer las poblaciones naturales (Palacios *et al.*, 2016; Prieto *et al.*, 2013; Pérez-Serrano *et al.*, 2021; Trucíos *et al.*, 2011).

2.7 Latencia de *P. laevigata* y tratamientos pre-germinativos

Las semillas de *P. laevigata* presentan una testa dura, por lo que se clasifica como una “semilla dura”. Esta impermeabilidad impide la imbibición de la semilla, debido a que es un fenómeno puramente físico, lo cual hace que sea un problema al pretender un manejo de las semillas para fines reproductivos (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Rivas *et al.*, 2005).

2.7.1 Tipos de latencia

La latencia se define como una fase inactiva de la semilla durante la cual el crecimiento y desarrollo se ven retrasados y los procesos metabólicos se ven reducidos a niveles mínimos (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

Además, la latencia se considera como una adaptación que contribuye a la supervivencia del individuo, porque limita la germinación cuando los factores ambientales son desfavorables para el desarrollo de la plántula (Varela y Arana, 2011). La intensidad de la latencia se encuentra influenciada por varios factores ambientales, tales como la luz, temperatura, humedad y espacio gaseoso; a medida que el grado de latencia disminuye, se amplía el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación (Abril-Saltos *et al.*, 2017; Varela y Arana, 2011). Sin embargo, también existen características intrínsecas que pueden inducir la latencia, las cuales pueden actuar solas o en combinación con los factores ambientales antes mencionados. Existen diferentes tipos de latencia que limitan los procesos de germinación, siendo de tipo: fisiológica (regulada por la temperatura), morfológica (se presenta por el subdesarrollo del embrión), morfofisiológica (cuando existe efecto de los dos tipos de dormancia anteriormente citadas), física (presente cuando existen capas impermeables al agua), y combinada, es decir, cuando una semilla presenta algunos o todos los tipos de latencia citados (Abril-Saltos *et al.*, 2017). La latencia física por impermeabilidad de la cubierta seminal retarda más la germinación (Merino-Valdés *et al.*, 2018).

Para solucionar esta problemática, se ha optado por someter las semillas a diferentes tratamientos previos a la germinación. Así pues, los tratamientos pre-germinativos son todos aquellos procedimientos necesarios para romper la latencia de las semillas inducida por la testa, esto permite que se facilite y aumente el proceso de germinación en condiciones adecuadas (Varela y Arana, 2011).

Los dos tratamientos más comunes para romper la latencia son:

A) Escarificación:

Los tratamientos de escarificación son un grupo de actividades previas a la germinación, que se centran en aquellas semillas que generalmente presentan una latencia exógena. Por ejemplo, la latencia física que presentan las semillas de *P. laevigata*. La escarificación tiene la finalidad de ablandar, perforar, rasgar o abrir la cubierta de las semillas para hacerla permeable, sin dañar el embrión ni el endospermo que se encuentran en su interior; logrando así la imbibición y el intercambio gaseoso (Ríos *et al.*, 2011; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Viveros *et al.*, 2015).

Este tratamiento a su vez se divide en:

Escarificación mecánica

Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo o pinzas. Es importante vigilar este proceso para no excederse en el tratamiento, pues de lo contrario la semilla sufriría daños que pueden reducir su capacidad de germinación.

Escarificación física

Las semillas son remojadas en agua corriente a diferentes temperaturas con la finalidad de remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta, lo que permite ablandar la testa. El tiempo de remojo puede ser de 12, 24, 48 y hasta 72 horas, y en algunos casos, cambiándoles el agua con cierta frecuencia.

Escarificación química

Consiste en remojar las semillas por períodos breves (15 minutos) a 2 horas, en compuestos químicos según la especie en cuestión. Durante el período de tratamiento, las semillas deben agitarse regularmente con el fin de obtener resultados uniformes. Al final del período de tratamiento se escurren los compuestos químicos y las semillas se lavan con abundante agua para eliminar algún resto de ellos.

La escarificación mecánica, física o química de semillas es una práctica recomendada para incrementar la germinación en el género *Prosopis*, pero no modifica su velocidad de emergencia (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

B) Estratificación

Este tratamiento se utiliza para romper la latencia fisiológica, consiste en colocar las semillas en un sustrato húmedo y someterlas a bajas temperaturas por un determinado tiempo. Las

temperaturas más eficientes para la estratificación en frío oscilan entre 0 °C y 10 °C, siendo el óptimo para muchas especies 5 °C (Pérez-Nasser *et al.*, 2019).

2.8 Estrategias de propagación

Las especies del género *Prosopis* se propagan normalmente por semilla (propagación sexual), ya sea a través de producción de plántulas en vivero o por siembra directa en el terreno definitivo (Tapia *et al.*, 2012; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013). También se propaga vegetativamente por medio de injertos o estacas, la importancia de estas estructuras radica en que permite mantener las características genéticas del individuo original; con interés particular para la producción en vivero con fines comerciales. El uso de injertos o estacas ha sido una técnica usada en especies con problemas para su reproducción o en peligro de extinción (Tapia *et al.*, 2012; Minchala-Patiño *et al.*, 2014; Carrillo *et al.*, 2020).

Por otro lado, la propagación *in vitro* es una técnica biotecnológica utilizada para el crecimiento y la multiplicación rápida de tejidos y órganos vegetales, debido a las soluciones nutritivas utilizadas que contienen elementos importantes entre los que destacan sales minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento vegetal, fuente de carbono, entre otros elementos necesarios para el crecimiento de la planta, además la técnica demanda el cultivo aséptico de las semillas (Carrillo *et al.*, 2020).

La micropropagación es considerada como la verdadera propagación clonal de un genotipo seleccionado utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, cuya finalidad es clonar plantas por propagación vegetativa y plantas que poseen semillas recalcitrantes o de propagación sexual, que son consideradas élite por algún criterio de interés, ya sea con fines comerciales o de conservación (Carrillo *et al.*, 2020).

En la Tabla 1 se resumen los trabajos que se han realizado para aumentar la propagación de *Prosopis laevigata* en la última década. De igual forma se pone en evidencia la poca información que se tiene al respecto con los trabajos que propagan al mezquite blanco *in vitro*, en contraste con aquellos que se realizan de forma *ex situ* (vivero).

Tabla 1. Trabajos realizados en la última década sobre las estrategias de propagación en invernadero e *in vitro* en *Prosopis laevigata*.

Título de la investigación	Autores	Año	Estructura de la planta	Condición
Escarificación de semillas de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>) para aumentar la eficiencia en la germinación	Juárez, J., Alvarado, M. & Valdez R.	2001	Semillas	Invernadero
Evaluación de diferentes tratamientos pre-germinativos y osmóticos en la germinación de semillas <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. y Bonpl. Ex Willd) MC Johnston.	Sobrevilla-Solís, J. A., López-Herrera, M., López-Escamilla, A. L., & Romero-Bautista, L.	2013	Semillas	Invernadero
Evaluación de inoculantes promotores de crecimiento en la producción de plantas de mezquite [<i>Prosopis laevigata</i> (Humb. Et Bonpl. ex Willd.) MC Johnst.] en Durango.	Quiñones, A., González, V., Chávez, J. R., Vargas, A., & Barrientos, F.	2013	Semillas	Invernadero
Producción de <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. et Bonpl ex Wild.) MC Johnst. con diferentes mezclas de sustrato.	Prieto, J. Á., Rosales, S., Sigala, J. Á., Madrid, R. E., & Mejía, J. M.	2013	Semillas	Invernadero
Cambios morfo-fisiológicos de plántulas de <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. et Bonpl ex Wild.) MC Johnst. ante diferentes ambientes de luz en vivero.	Basave, E., Rosales, S., Sigala, J., Calixto, C. & Sarmiento, H.	2017	Semillas	Invernadero
Alternativas de fertilización para producir <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. et Bonpl ex Wild.) MC Johnst.	De Jesús, G., Prieto, J., Vázquez, I., López M., Ciro, J. & Chávez A.	2018	Semillas	Invernadero
Potencial de establecimiento de <i>Prosopis laevigata</i> (árbol de uso	Sánchez-Hernández, M., Ayala-Garay, A. & Cortés, E.	2022	Semillas	Invernadero

múltiple), en suelos del distrito de riego 028 Tulancingo, Hidalgo.				
Morfología y escarificación de la semilla de mezquite, huizache y ahuehuete.	Rivas, G., Gonzales, G., Valencia, C., Sánchez I. & Villanueva, J.	2005	Semillas	<i>In vitro</i>
Clonal propagation of mesquite tree (<i>Prosopis laevigata</i> Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston). I. Via cotyledonary nodes.	Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Ávila, V. & Vernon-Carter, E.	2007	Semillas	<i>In vitro</i>
<i>In vitro</i> lead and nickel accumulation in mesquite (<i>Prosopis laevigata</i>) seedlings	Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Estrada-Zuñiga, M., Barrera, C., Vernon-Carter, E. & Cruz-Sosa, F.	2010	semillas	<i>In vitro</i>
Germination, <i>in vitro</i> propagation and soil acclimatization of <i>Acacia farnesiana</i> and <i>Prosopis laevigata</i>	Morales-Dominguez, J., Sabás-Díaz de León, D., Garduñez-Piña, C. & Pérez-Molphe-Balch, E.	2019	Semillas	<i>In vitro</i>

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha documentado que, en las zonas áridas y semiáridas del norte y centro de México, donde se distribuye *Prosopis laevigata* (Humb. & Willd.) M. C. Johnst., la densidad poblacional de la especie ha disminuido severamente, derivado de su inadecuado aprovechamiento por parte del ser humano que solo busca beneficios económicos con base a la explotación insostenible de la especie. Este hecho, aunado a la latencia física que presentan las semillas, ha ocasionado la casi nula regeneración natural de los mezquitales en zonas en donde su distribución era predominante, tal como se ha observado en los últimos años en San Juan Zitlaltepec, Zumpango, Estado de México, por lo que es necesario buscar alternativas que ayuden a la conservación de la especie.

Con base en las problemáticas planteadas anteriormente, esta investigación está enfocada en evaluar diferentes tratamientos pre-germinativos que rompan el estado de latencia en semillas de *P. laevigata*, para así determinar cuál de ellos permite obtener una germinación rápida, completa y uniforme en las semillas de la especie. Lo cual ayudaría a mejorar las condiciones de establecimiento de los cultivos, garantizando una mayor germinación para ampliar las posibilidades de su aprovechamiento ya sea con fines comerciales, como especie complementaria en sistemas agroforestales, o para fines de reforestación incrementando la densidad de los mezquitales silvestres, abriendo así la posibilidad de contribuir en el conocimiento sobre el cuidado y preservación de la especie en la zona de estudio en un futuro.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

- Evaluar el porcentaje de germinación de semillas de *Prosopis laevigata* sometidas a diferentes tratamientos pre-germinativos para su propagación *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos:

- Calcular el porcentaje de viabilidad de las semillas de *P. laevigata* mediante la prueba de tetrazolio en dos tiempos diferentes para estimar la calidad de las muestras y su uso en la propagación *in vitro*.
- Establecer un protocolo de desinfección para reducir la contaminación en semillas de *P. laevigata* durante su establecimiento *in vitro* utilizando diferentes concentraciones de un agente desinfectante en tres tiempos de inmersión.
- Comparar diferentes tratamientos pre-germinativos tanto mecánicos, físicos y químicos para el establecimiento *in vitro* de semillas de *Prosopis laevigata*.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Área de estudio

Se realizó la colecta de frutos en una población de *P. laevigata* ubicada en el “Cerro de la estrella” de San Juan Zitlaltepec perteneciente al municipio de Zumpango en el Estado de México durante el mes de octubre de 2021. La zona se ubica en las coordenadas 19°50'05"N y 99°08'28"O, a una elevación de 2360 msnm, el clima es semiárido, con lluvias escasas en gran parte del verano, la temperatura mínima extrema es de 2.3°C, la temperatura máxima registrada es de 31°C y la temperatura media anual de 14.18°C.

La precipitación total anual es aproximadamente de 700-800 mm, presentando lluvias durante los meses de mayo y junio. La temporada de frío se registra durante los meses de septiembre a diciembre y enero a marzo. Dadas las características anteriores y la composición vegetal del lugar, la población de *P. laevigata* pertenece a un ecosistema de matorral xerófilo (Ayuntamiento de Zumpango, 2019; CONABIO, 2021; Rzedowski, 1988).

5.2 Recolección de vainas y extracción de semillas

Las vainas se colectaron directamente de los árboles de manera manual cuando estas presentaron una coloración entre violeta y amarillo, se eligieron aquellas que no presentaron ningún daño mecánico según lo establecido por Di Sacco *et al.* (2019).

Los frutos se depositaron en bolsas de papel etiquetadas con la ubicación geográfica del sitio y la fecha de muestreo, se transportaron a las instalaciones del laboratorio de Micología Integral de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

Posteriormente, los frutos se remojaron en agua durante 72 horas para ablandar las vainas y extraer la semilla de forma manual, una vez obtenidas las semillas, se enjuagaron con agua de grifo para retirar la mayor cantidad de pulpa existente y finalmente se quitó el exceso de humedad con servitoallas (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

5.3 Almacenamiento de semillas

Una vez obtenidas las semillas, se contaron y agruparon en ocho lotes de 100 semillas cada uno; se secaron por exposición a la luz solar durante un día, debido a que presentan gran porcentaje de humedad en su contenido (25% o más), lo cual no es un buen indicador para mantener su viabilidad al momento de almacenarlas (Quiñones *et al.*, 2013; Pérez-Nasser *et al.*, 2019; Carrillo *et al.*, 2020). Una vez secas, las semillas se remojaron durante 10 minutos en 500 mL de agua con 2 g/l de fungicida (CAPTAN®) y 4 gotas de una solución bactericida al 0.35% (Microdyn®) (Juárez *et al.*, 2001). Finalmente, las semillas se almacenaron en bolsas Ziploc®, se etiquetaron y mantuvieron a temperaturas entre los 4 y 10°C, para su posterior uso (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

5.4 Prueba de viabilidad

Se determinó la viabilidad de las semillas en dos momentos diferentes a través de la prueba de tetrazolio; la primera a tres días de su almacenamiento y la segunda cuatro meses después, para ello se realizaron tres repeticiones de 30 semillas cada una en cada prueba.

A las semillas se les realizó un pequeño corte de la testa en la zona micropilar y se agregaron a una solución al 0.5% de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio, dejándolas reposar por 24 h a 30° C en oscuridad (Villarreal *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014; Pérez-Nasser *et al.*, 2019).

Se observaron a microscopio estereoscópico y se consideraron viables aquellas semillas que tuvieron el embrión teñido de color rojo, se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula (Villarreal *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2020):

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{No. Semillas teñidas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

5.5 Tratamientos pre-germinativos

Debido a la fisiología que presentan las semillas de esta especie se optó por usar tratamientos pre-germinativos que actúen directamente sobre las estructuras de las semillas a manera de interrumpir la latencia, se evaluaron diversos métodos de escarificación los cuales se agruparon como mecánicos, físicos y químicos (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2020).

Tratamientos mecánicos: Se utilizaron en total 135 semillas, los tratamientos a evaluar fueron: 1) lijado de la testa, el cual consistió en raspar la cubierta seminal de las semillas con una lija de agua del número 100 para debilitar el tejido, hacerlo permeable y así favorecer el intercambio de agua y oxígeno entre el exterior y el embrión; 2) uso de licuadora, se empleó una Licuadora American Blanca Mod. 1014 de 3 velocidades, en donde se colocaron las semillas junto con 500 mL de agua, manteniendo una velocidad media durante 10 segundos; 3) control, en el cual las semillas no se sometieron a ningún proceso de escarificación (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Minchala-Patiño *et al.*, 2014; Zeberio y Pérez, 2020). Se consideraron nueve repeticiones por tratamiento, cada unidad experimental contenía cinco semillas de *P. laevigata*.

Tratamientos físicos: Para este método se utilizaron en total 180 semillas, los tratamientos evaluados fueron: 1) semillas sumergidas en agua caliente no mayor a 80°C durante 10 minutos; 2) semillas sumergidas en agua a 80°C durante 5 minutos, seguido de un choque térmico con agua a una temperatura de -10°C durante el mismo tiempo; 3) semillas sumergidas en agua caliente a 70°C y dejarlas hasta llegar a la temperatura ambiente (20°C); y 4) Control

(Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Minchala-Patiño *et al.*, 2014; Carrillo *et al.*, 2020; Rivera *et al.*, 2020). Se consideraron nueve repeticiones por tratamiento, cada unidad experimental contenía cinco semillas de *P. laevigata*, las semillas que sirvieron de testigo no fueron escarificadas (Tapia *et al.*, 2012).

Tratamientos químicos: La evaluación de métodos químicos consistió en emplear ácidos fuertes que degradaran la cubierta seminal (Zeberio y Pérez, 2020), para esto se utilizaron los siguientes tratamientos: 1) Semillas sumergidas en ácido sulfúrico H₂SO₄ al 98% por 15 minutos; 2) semillas introducidas en acetona al 100 % (acetona pura) por 10 minutos; 3) semillas sumergidas en una solución de vinagre al 5% durante 15 minutos; 4) Control (Tapia *et al.*, 2012; Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2020). Para este tratamiento se utilizaron 180 semillas y se sembraron 5 por unidad experimental con nueve repeticiones por tratamiento. Las semillas que sirvieron de testigo no fueron escarificadas (Tapia *et al.*, 2012).

Cabe mencionar que, en cada tratamiento, las semillas se agitaron con varilla de vidrio a intervalos de tiempo regulares desde el momento en el que se incorporó el químico en el recipiente que las contuvo y una vez terminado el tiempo de inmersión, se realizó un enjuague utilizando agua corriente con la finalidad de neutralizar y eliminar restos de los químicos empleados (Varela y Arana, 2011; Carrillo *et al.*, 2020; Zeberio y Pérez, 2020).

5.6 Evaluación de un protocolo de desinfección de las semillas

Previamente al cultivo *in vitro* e inmediatamente después de ser sometidas a los métodos pregerminativos, las semillas fueron lavadas con 5 gotas de detergente común para trastes en agitación constante, después se enjuagaron tres veces con agua destilada (Carrillo *et al.*, 2020).

Posteriormente, bajo condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar, las semillas fueron introducidas en una solución de fungicida (CAPTAN[®]) al 2% (2 gr/L⁻¹) durante un minuto, aunque debido a la presencia constante de agentes patógenos en el cultivo (hongos), el tiempo se extendió a una hora (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013).

Enseguida, el material vegetal se sumergió en alcohol al 70% por un minuto y luego en hipoclorito de sodio en tres concentraciones (1, 2 y 5 %) con tres tiempos de inmersión diferentes (10, 15 y 20 minutos), finalmente se realizaron tres enjuagues de agua destilada estéril de 1 minuto cada uno. Las semillas fueron sembradas dentro de frascos con medio de cultivo MS preparados y esterilizados previamente, se taparon y sellaron con Papel Aluminio Reynolds Wrap[®] y Parafilm[®] (Minchala-Patiño *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2020). Se evaluó el porcentaje de contaminación y el porcentaje de plántulas establecidas en un período de 4 días.

5.7 Preparación de medio de cultivo y siembra

Se preparó medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado de sacarosa (30 g/L), sin reguladores de crecimiento y solidificado con agar (7 g/L) (Mayo-Mosqueda *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2020). Cabe destacar que el pH del medio fue ajustado a 5.8 con una solución de NaOH 1N y HCl 1N previo a la esterilización del medio, la cual se realizó por 20 min a 120°C y 15 libras de presión (Psi) (Rodríguez *et al.*, 2014; Mayo-Mosqueda *et al.*, 2017).

Por último, una vez que las semillas se sembraron dentro de sus respectivos frascos, estos fueron tapados con Papel Aluminio Reynolds Wrap[®], sellados con Parafilm[®] y agrupados para ser marcados de acuerdo con el tratamiento al que fueron sometidas las semillas de mezquite.

5.8 Condiciones de incubación

Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación con el propósito de brindar las condiciones adecuadas a las semillas para su crecimiento; se mantuvieron a una temperatura promedio de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, con humedad relativa de 60%, intensidad lumínica promedio de 4000 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad durante el tiempo experimental (Villarreal *et al.*, 2013; Mayo-Mosqueda *et al.*, 2017; Carrillo *et al.*, 2020; Rivera *et al.*, 2020). Se realizaron conteos periódicos cada cuatro días durante 12 días, tomando como criterio para la germinación de la semilla la emergencia de la radícula y el desprendimiento de los cotiledones de la testa.

5.9 Análisis de datos

La pérdida de viabilidad del lote de semilla se obtuvo mediante el cálculo de la diferencia de los promedios del porcentaje de viabilidad en los dos tiempos evaluados.

Se evaluó el porcentaje de germinación *in vitro* de cada tratamiento pre-germinativo durante un periodo de 15 días mediante la siguiente fórmula (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Pérez-Nasser *et al.*, 2019; Carrillo *et al.*, 2020):

$$P = (\text{número de semillas germinadas} / \text{total de semillas}) \times 100$$

Se comprobó la normalidad de los datos con la prueba de Anderson Darling y dado que el total de series de datos no presentaron normalidad y no se ajustaron a la campana de Gauss, se procedió a realizar pruebas no paramétricas. Se determinó si existen diferencias significativas entre tratamientos mediante un análisis de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba posterior de Mann-Whitney para discernir cuál tratamiento demostró tener mejores resultados para la propagación de *P. laevigata*.

6. RESULTADOS

Tras la colecta del material biológico se obtuvieron un total de 900 vainas de mezquite, de las cuales se extrajeron 1500 semillas, sin embargo, la mayoría de ellas presentaban plaga de gorgojo, por lo que se escogieron aquellas que se encontraban en buenas condiciones dando un total de 800 semillas para realizar las pruebas de pre-germinación.

6.1 Prueba de viabilidad

Se obtuvieron las medias del porcentaje de viabilidad para cada prueba, en la primera prueba se encontró que las semillas de *P. laevigata* tenían 88% de viabilidad (previo a su uso en los diferentes tratamientos pre-germinativos); posterior a los cuatro meses almacenadas en refrigeración, este valor se redujo a 59.4%, es decir, hubo una pérdida del 28.6%. Cabe destacar que las semillas almacenadas presentaron indicios de contaminación por hongos después de este periodo, por lo que ya no fue posible utilizarlas para pruebas posteriores.

6.2 Método de desinfección

Se realizó la evaluación de diez tratamientos de desinfección superficial en semillas de *Prosopis laevigata* con el fin de establecer las condiciones adecuadas para la propagación *in vitro* de dicha especie. En la tabla 2 se muestra el efecto de dichos tratamientos sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de plántulas establecidas.

En ambos casos, el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre los tratamientos (H: 10.24; $p=0.25^{-5}$; N=40; t=10 para germinación y H: 6.64; $p=0.52^{-5}$; N=40; t=10 para contaminación). La solución de cloro al 5% por 20 minutos generó un menor porcentaje de contaminación (8%) y un 12% de germinación, por el contrario, el tratamiento de cloro al 5% por 10 minutos permite un porcentaje mayor de germinación (24%) y un 64% de contaminación, por tanto, el tiempo de inversión adecuado para reducir la presencia de patógenos en el medio de cultivo es de 20 minutos utilizando la solución de cloro al 5%.

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión sobre el porcentaje de semillas germinadas y contaminadas en la propagación *in vitro* de *Prosopis laevigata*.

Tratamientos	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión	Germinación (%)	Contaminación (%)
T1	1	10	16 ^b	44 ^b
T2	1	15	8 ^b	20 ^b
T3	1	20	16 ^b	16 ^b
T4	2	10	16 ^b	56 ^b
T5	2	15	8 ^b	28 ^b
T6	2	20	20 ^b	28 ^b
T7	5	10	24 ^a	64 ^b
T8	5	15	12 ^b	36 ^b
T9	5	20	12 ^b	8 ^a
T10 (Control)	0	0	0	12 ^b

Nota: superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

6.3 Tratamientos pre-germinativos

La evaluación de los diferentes métodos pre-germinativos se realizó en un periodo de 12 días, a continuación, se resumen los resultados obtenidos para cada tipo de tratamiento.

Tratamiento mecánico

Con respecto a la germinación, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis demostró diferencias significativas entre los tratamientos ($H: 19.57$; $p=3.46^{-5}$; $N=81$; $t=3$), de éstos, tanto la condición de licuadora ($50.37 \pm 27.38\%$ de germinación), como el uso de la lija ($35.55 \pm 26.79\%$) difieren del control de acuerdo con la prueba posterior de Mann-Whitney (Figura 4A).

Por otro lado, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis también señaló diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la contaminación ($H: 19.6$; $p= 3.59^{-5}$; $N=81$; $t=3$); la prueba posterior de Mann-Whitney exhibió diferencias entre los tratamientos en donde la mayor contaminación se presentó ante el uso de la lija ($56.29 \pm 31.39\%$), seguido de la licuadora y el control ($40.74 \pm 33.50\%$ y $17.03 \pm 21.27\%$, respectivamente) (Figura 4B).

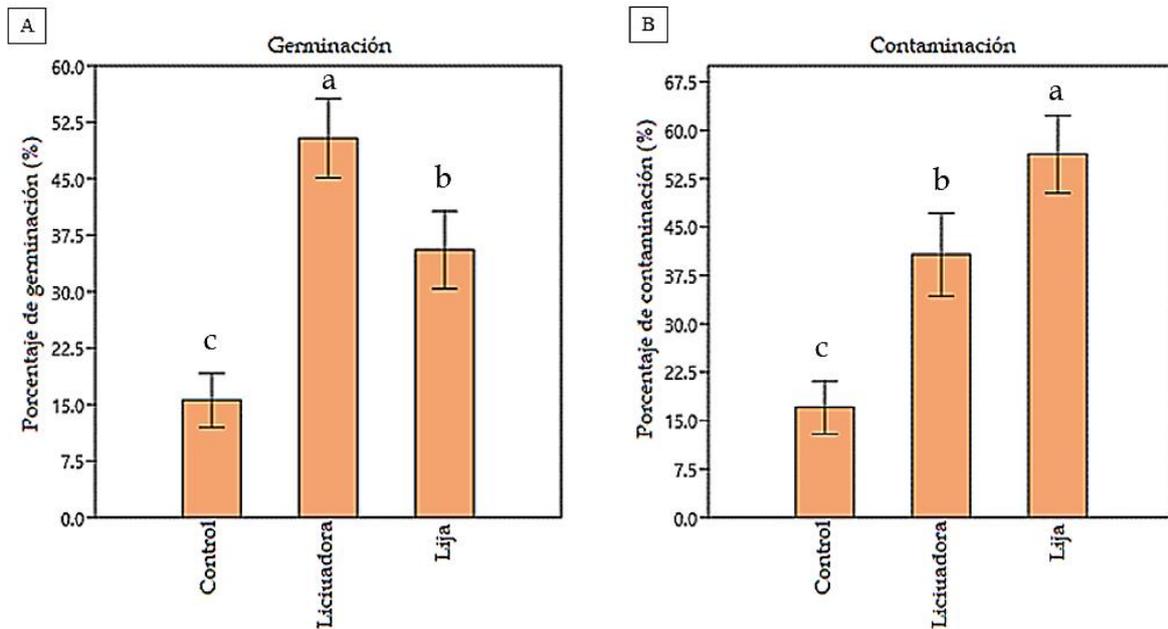


Figura 4. Comparación entre tratamientos de escarificación mecánica en semillas de *P. laevigata*. A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación. Los intervalos representan la desviación estándar de cada tratamiento.

Tratamiento físico

Con respecto al tratamiento físico, todas las condiciones de prueba mostraron diferencias significativas entre sí para la germinación de las semillas, esto se refleja en la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($H= 26.42$; $p= 2.39^{-6}$; $N= 108$; $t= 4$). La prueba posterior de Mann-Whitney demostró significancia entre los tratamientos donde la mejor condición fue aquella en donde las semillas fueron sometidas a agua caliente (80°C) por 5 minutos, más agua fría por otros 5 minutos con un $38.52 \pm 22.82\%$ de germinación (Figura 5A).

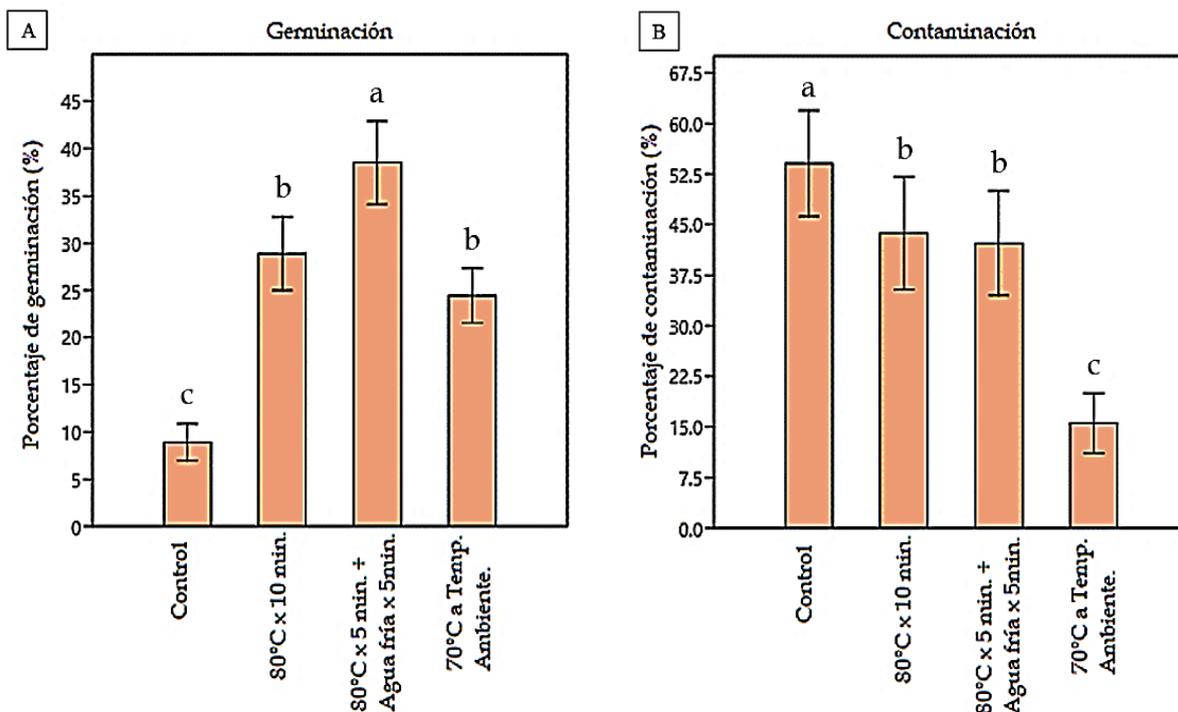


Figura 5. Comparación entre tratamientos pre-germinativos físicos en semillas de *P. laevigata*. A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación. Los intervalos representan la desviación estándar de cada tratamiento.

La contaminación también estuvo presente el tratamiento de agua caliente (80°C) por 5 minutos ($42.22 \pm 40.128\%$), más agua fría por otros 5 minutos; se identificaron diferencias significativas entre las condiciones de acuerdo con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($H= 10.44$; $p= 0.01$; $N= 108$; $t= 4$). El mayor porcentaje de contaminación lo obtuvo el lote de semillas control, con $54.07 \pm 40.69\%$, y el de menor porcentaje fue el de las semillas sometidas a agua caliente (70°C) hasta llegar a una temperatura ambiente (20°C) ($15.55 \pm 23.09\%$) (Figura 5B).

Tratamiento químico

Se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la germinación (Kruskal-Wallis $H= 44.18$; $P= 1.24^{-5}$; $N= 108$; $t=4$). La prueba posterior de Mann-Whitney reveló diferencias entre los tratamientos y que el mayor porcentaje de germinación lo tiene la condición de acetona obteniendo un $40 \pm 24.80\%$, seguida del vinagre ($11.85 \pm 10.01\%$), ácido sulfúrico ($7.40 \pm 9.84\%$) y finalmente el control ($0.74 \pm 3.84\%$) (Figura 6A).

Con respecto a la contaminación, también se identificaron diferencias significativas entre las distintas condiciones (Kruskal-Wallis $H= 16.36$; $P= 0.63^{-5}$; $N= 108$; $t=4$). Por su parte, la prueba posterior de Mann-Whitney permite discernir que el lote de semillas control presentó la mayor media porcentual de contaminación ($73.33 \pm 31.86\%$), seguida de la condición de ácido sulfúrico y la acetona ($42.96 \pm 35.46\%$ y $42.22 \pm 44.14\%$, respectivamente), el tratamiento con menor contaminación fue el de vinagre con un $31.11 \pm 38.56\%$ (Figura 6B).

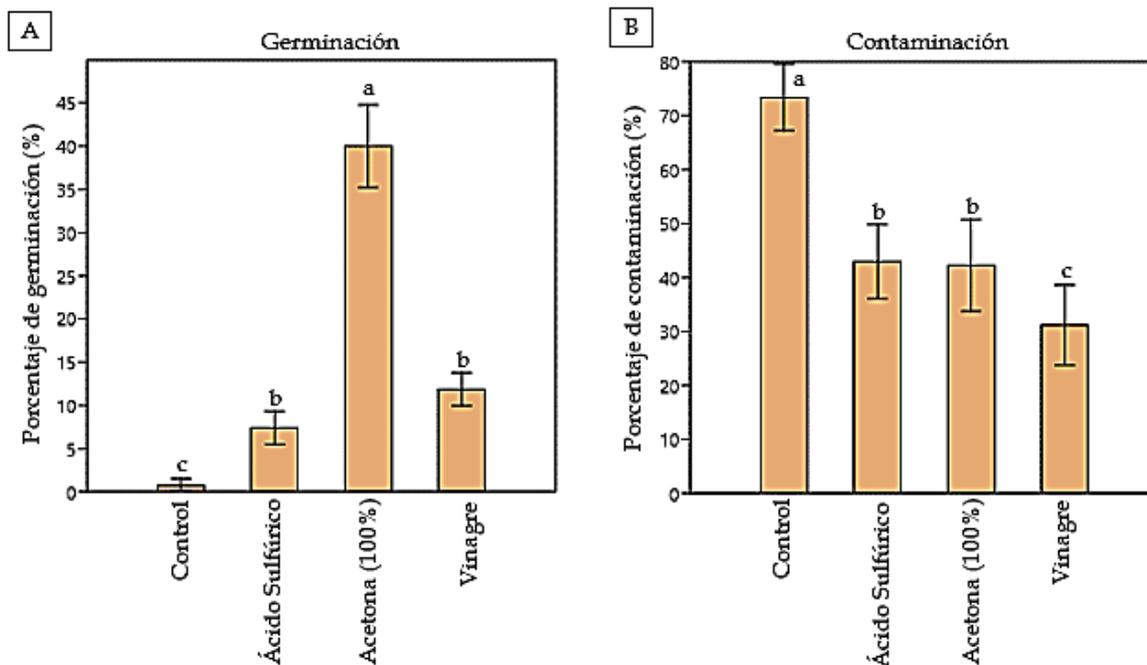


Figura 6. Comparación entre tratamientos pre-germinativos químicos en semillas de *P. laevigata*. A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación. Los intervalos representan la desviación estándar de cada tratamiento.

Finalmente, se eligió la condición con mayor porcentaje de germinación de cada tratamiento (mecánico, físico y químico) para determinar cuál de ellos arrojaba mejores resultados, sin embargo, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis demostró que no hay diferencias significativas entre las tres condiciones (licuadora, 80°C 5 min + 5 min de agua fría, acetona pura) ($H= 3.42$; $p= 0.16$; $N= 81$; $t= 3$) (Figura 7A).

Tomando en cuenta los porcentajes de germinación de cada tratamiento, se observó que el método mecánico, con la condición de licuadora, presentó los valores más altos de germinación ($50.37 \pm 27.38\%$) en comparación con los otros dos tratamientos. Lo mismo sucedió con los porcentajes de contaminación, pues dicha condición manifestó un valor de $40.74 \pm 33.50\%$ el menor valor con respecto a los otros tratamientos (Figura 7B).

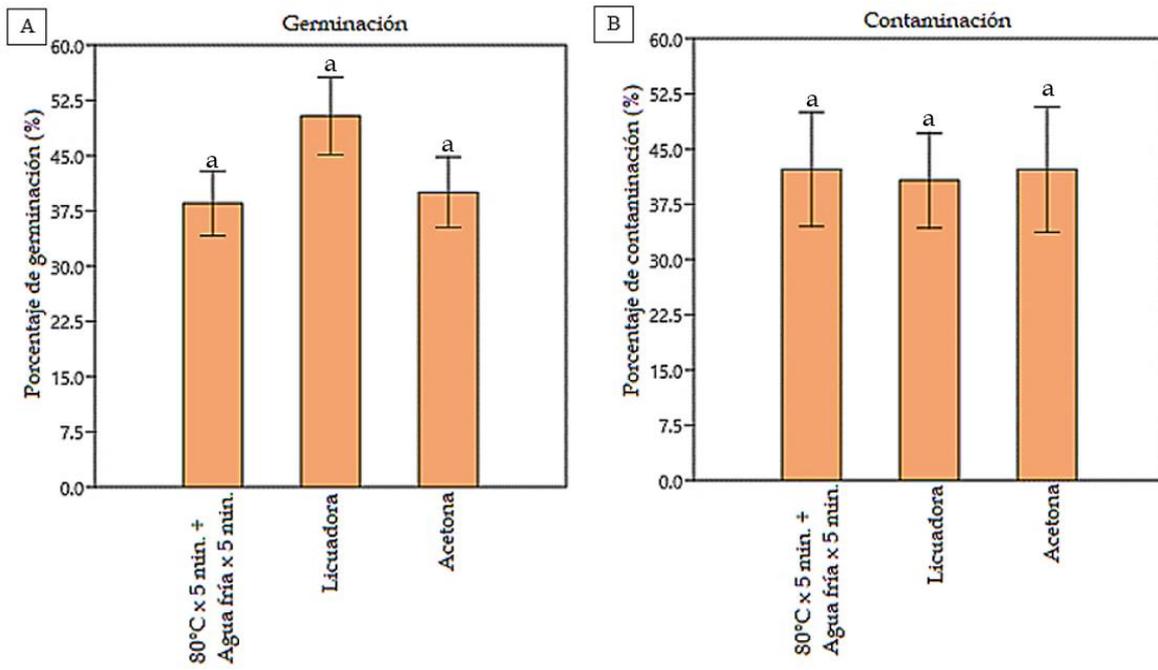


Figura 7. Comparación entre tratamientos pre-germinativos del tipo mecánico, físico y manual. A) Porcentaje de germinación, B) Porcentaje de contaminación. Los intervalos representan la desviación estándar de cada tratamiento.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se logró establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *P. laevigata* a partir del establecimiento de sus semillas mediante la evaluación de diferentes tratamientos pre-germinativos.

7.1 Viabilidad de las semillas

Se logró cuantificar un 88% de viabilidad en las semillas de *P. laevigata*, de igual manera, Hernández *et al.* (2021) y Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2022), demostraron obtener porcentajes similares en la misma especie, con un 100% y 80% respectivamente, lo cual indica que este porcentaje obtenido fue el esperado a pesar de que las semillas se recolectaron tres meses después del periodo recomendado por los autores. Por otro lado, los resultados son diferentes a los obtenidos por Villareal *et al.* (2013) en *Prosopis glandulosa*, con 62% de viabilidad, esta diferencia puede deberse a que las características morfológicas entre las especies son diferentes.

La pérdida de viabilidad que se presentó en las semillas posterior a los cuatro meses desde la primera prueba, se debió a diversos factores tanto bióticos como abióticos (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2022). En este sentido, Ríos *et al.* (2011), Rodríguez-Sauceda *et al.* (2014) y Hernández *et al.* (2021), sugieren que para tener un buen vigor y viabilidad en las semillas de esta especie, se deben recolectar a finales de julio y principios de agosto, debido a que son propensas a tener plagas por insectos, mismos que pueden debilitar la estructura de las semillas o dañarlas, tal como sucedió con las semillas en el presente trabajo, las cuales presentaron daños parciales por plaga de gorgojo, un insecto muy común en los árboles de mezquite (Johnson, 1994), de hecho en la investigación de Merlín *et al.* (2009), reportaron daños parciales y totales en las semillas ya almacenadas a causa de *Algarobius prosopis*.

Con respecto a los factores abióticos que afectan la viabilidad, la FAO (2014), establece que las semillas ortodoxas, como son las de *P. laevigata*, se deben almacenar en condiciones de refrigeración con temperaturas entre 5 y 10 °C y una humedad relativa de $15 \pm 3\%$, con contenidos de humedad de las semillas de 6 y 9%, esto es para que su metabolismo se retrase y, por consiguiente, se prolongue su viabilidad durante su almacenamiento. De hecho, Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2022), en su estudio sobre el efecto del almacenamiento sobre la calidad fisiológica de semillas de *Prosopis laevigata*, afirman que tanto los índices de germinación y el porcentaje de plántulas normales se reducen con un incremento de la humedad y la temperatura de almacenamiento, esto lo mostraron con semillas que fueron almacenadas aproximadamente por diez años, mismas que contenían humedad que oscilaba entre 8.8 y 9.4%, mantenidas a una temperatura de entre 15 y 18 °C. Cabe destacar que ningún trabajo previo ha realizado una comparación de la viabilidad de las semillas antes y después de ser almacenadas, por lo que este estudio brinda conocimiento de dicha pérdida de viabilidad de germinación.

De acuerdo con las Normas del ISTA 2022 (Asociación Internacional de Análisis de Semilla), el contenido de humedad necesario para almacenar las semillas de mezquite es de 6 a 7%, respetando temperaturas de almacenamiento de entre 4 y 10 °C hasta su posterior uso. Desafortunadamente, a pesar de que las semillas que se utilizaron para este trabajo fueron expuestas al sol para eliminar la humedad después de haberlas retirado de sus vainas, era pertinente medir el porcentaje de humedad posterior a la exposición como lo denota la ISTA 2022, con la finalidad de llegar al porcentaje que requieren las semillas antes de su almacenamiento, es por este motivo que las semillas presentaron contaminación por hongos y de esta forma dejaron de ser viables con el paso del tiempo.

7.2 Protocolo de desinfección

El uso del Captan® y Microdyn® para frenar la contaminación por hongos y bacterias que se presentó en las semillas no fue eficiente como se esperaba. Esto a pesar del amplio espectro que posee el Captan® dado que interactúa con los tioles celulares para producir tiofosgeno, compuesto tóxico que interfiere en el proceso de respiración de las células fúngicas, inhibiendo la producción de las esporas y el desarrollo micelar (Peláez-Álvarez *et al.*, 2016).

A partir de los resultados obtenidos con el bactericida y fungicida, se requirió hacer pruebas con tratamientos de desinfección superficial usando diferentes concentraciones de cloro a distintos tiempos de inmersión, se observó que, a mayor concentración y tiempo de sumersión en hipoclorito de sodio, el porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en las semillas disminuye. Sin embargo, estas llegan a experimentar una tasa germinativa baja, lo que se refleja a su vez en una menor cantidad de plántulas establecidas *in vitro*.

Estos resultados son similares a los descritos por Rivera *et al.* (2020), con semillas de *Prosopis padilla*, quienes evaluaron nueve tratamientos de desinfección con concentraciones de 1.2, 1.5 y 1.8% de NaOCl por 15, 20 y 25 minutos. Al igual que en este proyecto, ellos obtuvieron una disminución de contaminación y germinación a medida que aumentaba la concentración y los tiempos evaluados; de los cuales se destacó que el NaOCl al 1.2% durante 15 minutos es uno de los tratamientos con menor contaminación y mayor germinación de semillas (3.3% y 50%, respectivamente). No obstante, dicho resultado factible se debe también al tratamiento pre-germinativo que emplearon, dado que ellos emplearon agua caliente antes del protocolo de desinfección, lo que permitió eliminar en gran parte los contaminantes que se encuentran en la testa, por lo que es razonable que para la desinfección ya no se requiere concentraciones y tiempos de inmersión altos de NaOCl para obtener un mayor porcentaje de contaminación.

En el presente estudio, se requirió de una concentración de 5% de NaOCl por 20 minutos para tener resultados efectivos, es decir del 8% de contaminación. Lo anterior se asemeja a los resultados obtenidos por Minchala-Patiño *et al.* (2014), quienes trabajaron con la especie *P. limensis* y demostraron que al usar NaOCl a una concentración de 5.5% durante 15 minutos, el porcentaje de contaminación en sus semillas oscilaba entre 7-27%. En ambos casos la presencia de plántulas establecidas fue baja (60%), debido al daño progresivo que ocasiono el hipoclorito de sodio a las semillas, esto se debe al tratamiento pre-germinativo que se usó, ya que el

implementar tratamientos mecánicos abre la posibilidad del contacto directo de la sustancia química con el embrión.

Algunos estudios afirman que para la propagación *in vitro* de diversas especies de plantas, se ha utilizado ampliamente el etanol al inicio del proceso de desinfección, esto se debe a que el reactivo actúa desnaturizando las proteínas, disuelve las capas lipídicas y procede como agente deshidratante, por lo que es letal para bacterias, pero irregular para hongos y virus (Flores *et al.*, 2008).

En virtud de lo anterior, también se requiere de un reactivo con mayor poder desinfectante, de manera que hacer uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) brinda mejores resultados al eliminar microorganismos resistentes, gracias a que los inactiva mediante la oxidación de su material celular, así mismo, el cloro actúa directamente sobre las proteínas de las membranas celulares y las enzimas de los mismos desnaturizándolas (Medel *et al.*, 2001).

No obstante, el uso de NaOCl en presencia de agua desprende oxígeno que oxida la materia orgánica, en ese caso, las semillas expuestas al reactivo mostrarán un daño progresivo en el embrión, a causa del tiempo de exposición y la concentración del reactivo en el agua.

7.3 Tratamientos pre-germinativos

Los resultados exhibidos en este trabajo confirman la presencia de latencia física en las semillas de esta especie, esto con base a los porcentajes de germinación que se obtuvieron en las semillas control de cada tratamiento. Dicha latencia coincide con las numerosas investigaciones de autores que han trabajado con varias especies arbóreas de la familia de las fabáceas y puntualmente en el género *Prosopis*.

En relación con los tratamientos pre-germinativos, las semillas germinaron en periodos cortos de tiempo, gracias a la humedad que aún seguía en contacto con ellas, haciendo que los inhibidores químicos de germinación volvieran la testa más permeable (Sobrevilla-Solís *et al.*, 2013; Juárez *et al.*, 2001).

Dentro de los tipos de escarificación empleados en esta investigación (físico, químico y mecánico) se encontró que el tratamiento mecánico, con la condición de licuadora, registra el valor más alto en porcentajes de germinación ($50.37 \pm 27.38\%$). Dicho resultado fue similar al presentado por Rivas *et al.* (2005) en su trabajo con semillas de mezquite, sin especificar la especie con la que trabajaron, en donde compararon seis métodos mecánicos de escarificación, obteniendo porcentajes bajos de germinación, siendo rescatable la condición de licuadora por 30 segundos el que mostró mejores resultados (53%). Sin embargo, en el presente trabajo no fue posible describir las revoluciones por minuto (r.p.m) a las cuales fueron sometidas las semillas, por lo que es posible que, en algunas de ellas los tejidos seminales hayan sufrido un daño mecánico generando los resultados observados.

Del mismo modo, Sobrevilla-Solís *et al.* (2013), describen bajos porcentajes de germinación en semillas de *Prosopis laevigata* al usar esta misma condición (15%), esto a pesar de la mínima exposición de tiempo dentro de la licuadora con una velocidad media a la que se sometieron las semillas, tal y como se realizó en la presente investigación. Por lo tanto, aun cuando se someten las semillas a revoluciones medias o altas en una licuadora doméstica, éstas pueden alcanzar mayores tasas de germinación cuando el tiempo se prolonga, tal como ocurrió en el trabajo de Rivas *et al.* (2005).

Por otra parte, el porcentaje de germinación obtenido mediante el raspado mecánico con lija ($35.55 \pm 26.79\%$) fue menor para este trabajo en comparación con la condición de licuadora, lo que confirma la presencia de un tegumento duro en las semillas de esta especie y que, además, esta condición no fue suficiente para superar la barrera física de las mismas. Sin embargo, los trabajos de Rivas *et al.* (2005) y de Sobrevilla-Solís *et al.* (2013), proponen la escarificación mecánica con lija como un método adecuado para estimular la germinación en *Prosopis* spp., a pesar de que sus porcentajes de germinación fueron de tan solo 20%. Además, Yépez & Arboleda (2009), afirman que varios tratamientos mecánicos (como triturar, cortar o perforar) han demostrado ser efectivos para romper la cubierta de las semillas y mejorar los valores de germinación, pero dichas las técnicas pueden variar dependiendo del ejecutante, obteniendo con estos métodos elevados porcentajes de germinación en distintas especies del género *Prosopis*.

Con respecto a las condiciones del tratamiento químico, para este trabajo, el uso de la acetona por 10 minutos presentó el segundo mejor resultado ($40 \pm 24.80\%$ de germinación). Rivera *et al.* (2020) encontraron resultados similares en *Prosopis padilla*, efectuando el mismo tiempo de remojo en acetona pura para sus semillas (33.3% de germinación). De igual forma el trabajo de Tapia *et al.* (2012), expusieron buenos resultados con la acetona al 100% con un tiempo de inmersión de 30 minutos para *Prosopis chilensis* (70% de germinación), por lo que la acetona pura tiene buenos efectos a mayor tiempo de inmersión, a pesar de esto, en este estudio se comprobó que con tan sólo 10 minutos se obtiene un efecto importante para la germinación de semillas de *Prosopis laevigata*.

La condición de ácido sulfúrico no presentó un efecto favorable sobre la latencia de las semillas de *Prosopis laevigata*, dado que solo se obtuvo $7.40 \pm 9.84\%$ de germinación. El resultado antepuesto fue igualmente bajo como lo presentado por Sobrevilla-Solís *et al.* (2013) con 2.5% de germinación, estos autores justifican su bajo porcentaje con base en la concentración del ácido, así como el tiempo al que se sometieron las semillas, dado que el H₂SO₄ pudo haber dañado las cubiertas de la semilla generando también un daño al embrión (D'Aubeterre *et al.*, 2002). De hecho Utello *et al.*, (2023) señalaron que las semillas tratadas con ácido sulfúrico durante un largo período de tiempo pueden sufrir daños internos por el calor generado por la reacción de contacto entre el ácido y la testa de la semilla. Sin embargo, el hecho que se presentara un evento de germinación mínimo, plantea la posibilidad de que este método pueda ser útil al variar el tiempo que las semillas están expuestas a estos agentes químicos y la concentración del ácido utilizado.

En contraposición a lo anterior, Villareal *et al.* (2013) mencionan que el embebido en ácido sulfúrico concentrado es el método más común para tratar las semillas de *Prosopis glandulosa*, así como el de otras leguminosas, debido a que este ácido actúa desintegrando la lámina media de las macroesclereidas separando dichas células, aflojando el tegumento y perforando la superficie, lo que facilita la germinación, tal y como se presentó en su investigación. Cabe destacar que en su trabajo no se detalla la concentración del químico utilizado, lo cual podría influir en los resultados que obtuvieron.

A pesar de que el uso del vinagre por 15 minutos permitió obtener germinación de las semillas ($31.11 \pm 38.56\%$), se necesita hacer más ensayos para poder mejorar el resultado, dado que no hay investigaciones que demuestren que sea una buena condición pre-germinativa para la propagación de *Prosopis laevigata*.

En el caso de los tratamientos físicos, someter las semillas a un choque térmico, resultó ser la tercera condición que se destaca con valores de germinación aceptables de $38.52 \pm 22.82\%$. En el trabajo de Juárez *et al.* (2001), obtuvieron 60% de germinación con la aplicación de agua caliente a 80 °C durante 8 minutos en semillas de *Prosopis laevigata*; ellos mencionan que, para una germinación adecuada de las semillas, la temperatura idónea debe oscilar entre los 75 °C y 80 °C, por encima de ello la germinación disminuye por daños en el embrión. Así mismo, Yépez y Arboleda (2009) argumentan que el remojar las semillas en agua caliente modifica las cubiertas duras de las semillas, removiendo de esa forma los inhibidores, acortando el tiempo de germinación.

Usando la misma condición, Sobrevilla-Solís *et al.* (2013), reportaron un bajo porcentaje de germinación (5%) para la misma especie y manifiestan que a temperaturas superiores a 70 °C se puede dañar progresivamente al embrión generando una inhibición en la germinación. Esto se ve ejemplificado en la investigación de Rivas *et al.* (2005), quienes escarificaron semillas de mezquite, sin especificar la especie, a través de tratamientos físicos con condiciones de temperatura que iban de 90°C a 100°C en intervalos de tiempo de 5, 10 y 20 minutos, obteniendo porcentajes de germinación bajos, siendo rescatable la condición de agua caliente por 10 minutos la que presenta un valor elevado (33%) comparado con los otros intervalos de tiempo.

8. CONCLUSIONES

La viabilidad de semillas de *P. laevigata* fue de 88%, sin embargo, disminuyó un 28.6% en función del tiempo de almacenamiento, por lo que es necesario seguir protocolos ya establecidos por las Normas del ISTA para su conservación.

Se estableció un protocolo de desinfección superficial en las semillas de *P. laevigata* mediante el uso de NaOCl a una concentración de 5% por 20 minutos, el cual redujo el porcentaje de contaminación a 8% en las semillas de esta especie. Cuando la contaminación por bacterias y hongos es persistente, es preciso incorporar fungicidas y bactericidas de amplio espectro que cumplan la misma función que dicho químico para reducir el problema.

Los tratamientos de escarificación evaluados permitieron eliminar la latencia física en las semillas de *P. laevigata*, siendo el tratamiento mecánico con la condición de licuadora el más eficiente (50.37%), esto debido a que la testa impermeable fue dañada y debilitada directamente por medio de la abrasión hecha por las aspas de la licuadora doméstica.

Tanto el tratamiento químico (acetona), como el físico (cambio de temperatura), tuvieron resultados igualmente favorables, por lo que es necesario incorporarlos en investigaciones posteriores mejorando sus condiciones y procedimientos con el fin de eliminar la latencia y elevar el porcentaje de germinación en semillas de *P. laevigata*.

Estos resultados son importantes para futuras investigaciones encaminadas a la propagación *in vitro* de *P. laevigata*, con el fin de conservar su germoplasma, además de establecer plántulas libres de patógenos que puedan ser utilizadas para su reintroducción en ambientes áridos o donde su población presente reducción drástica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abril-Saltos, R. V., Ruiz-Vásquez, T. E., Alonso-Lazo, J., Cabrera-Murillo, G. M. (2017). Germinación, diámetro de semilla y tratamientos pre-germinativos en especies con diferentes finalidades de uso. *Agronomía Mesoamericana*, 703-717.
- Arriaga, V., Cervantes, V., Vargas-Mena, A. (1994). *Manual de conservación con especies nativas: Colecta y preservación de semillas, propagación y manejo de plantas*. Instituto Nacional de Ecología, UNAM.
- Ayuntamiento de Zumpango. (2019). *Atlas de riesgos: Municipio de Zumpango 2019-2021*. <http://zumpango.gob.mx/atlas-de-riesgos/> (Marzo 2022).
- Basave, E., Rosales, S., Sigala, J., Calixto, C., Sarmiento, H. (2017). Cambios morfo-fisiológicos de plántulas de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Wild.) MC Johnst. ante diferentes ambientes de luz en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(44), 21.
- Bernal-Ramírez, L., Zavala-Hurtado, J., Jiménez, M., Cano-Santana, Z., Fornoni, J. (2019). El microcosmos de *Prosopis laevigata* alberga una alta diversidad florística en el Valle de Zapotitlán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, 1-14.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Estrada-Zúñiga, M. E., Barrera Díaz, C. E., Vernon-Carter, E. J., y Cruz-Sosa, F. (2010). *In vitro* lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(1), 01-09.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Ávila, V.M., Vernon-Carter, E.J. (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston). I. Via cotyledonary nodes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 260-266.
- Carrillo, F., García-Cochagne, J., Cabrera, R., Vásquez, J., Tuisima, L., Escobar, H., Aguirre, O., Quintana, C., Amasifuen, C. (2020). *Manual técnico para la conservación y propagación de especies de algarrobo (Prosopis spp.)*. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).
- CONABIO. (2021). *Matorrales*. <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/Matorral> (Julio 2021)
- Coutiño, E., Pérez, R., García, R., y Herbert, A. (2010). Plata Coloidal y Salud. *UniverSalud*. 6(12). 56-68.
- D'Aubeterre, R., Principal, J., y García, J. (2002). Efecto de diferentes métodos de escarificación sobre la germinación de tres especies del género *Prosopis*. *Revista Científica*, 12(2), 575-577
- De Jesús, G., Prieto, J., Vázquez, I., López M., Ciro, J. & Chávez A. (2018). Alternativas de fertilización para producir *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Wild.) MC Johnst. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(49), 234-251.

- Di Sacco, A., Way, M., León-Lobos, P., Suarez-Ballesteros, C. I. (2019). *Manual de recolección, procesamiento y almacenamiento de semillas de plantas silvestres*. V1. 2. Royal Botanic Gardens Kew.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1), 00-00.
- Flores, A., Álvarez J., Rodríguez de la O, J. & Corona, A. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H. B. K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, 10(2): 27-33.
- Hernández, F., Vega, M., Rodríguez-Trejo, D., Bonilla, R., Pimentel, L., Hernández D., Vera, J., Mohedano L. (2021). *Prosopis laevigata* (H. & B. ex Willd.) M.C. Johnst. (Fabaceae). En: Rodríguez-Trejo, D. A (Coord.). *Semillas de Especies Forestales* (1^{era} ed., pp. 285-293). División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de Méx.
- ISTA (2022). *International Rules for Seed Testing*. Volume 2022, Number 1. Switzerland. 22p.
- Juárez, J. R., Alvarado, M., y Valdez, R. D. (2001). Escarificación de semillas de mezquite (*Prosopis laevigata*) para aumentar la eficiencia en la germinación. *UAGRO*, 01, 1-8.
- Johnson, C. (1994). *Manual sobre insectos que infestan la semilla de Prosopis*. Departamento de Ciencias Biológicas. Northern Arizona University EE. UU.
- Mayo-Mosqueda, A., Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Cazares-Camero, J. G. (2017). Estrategias para mejorar la germinación de semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendland). *Polibotánica*, (43), 246-254.
- Medel, A; Flores, A; Armendáriz, S., Santamaría, E. (2001). Técnicas de desinfestación y siembra *in vitro* de embriones maduros de falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *Fissuratus* (Eng.) Shumann), (Cactaceae). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 2(1): 53-59.
- Medina, G. R., Cervantes, G. G., Castro, C. M. V., Cohen, I. S., Díaz, J. V. (2005). Morfología y escarificación de la semilla de mezquite, huizache y ahuehuate. *Técnica Pecuaria en México*, 43(3), 441-448.
- Merino-Valdés, M., Andrés-Meza, P., Leyva-Ovalle, O. R., López-Sánchez, H., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R., Cebada-Merino, M., Serna-Lagunes, R., Espinosa-Calderón, A., Tadeo-Robledo, M., Sierra- Macías, M., Del Rosario-Arellano, J. (2018). Influencia de tratamientos pregerminativos en semillas de chile manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *Acta Agronómica*, 67(4), 531-537.
- Merlín, B., Bustamante, V., Rosales, R. (2009). Calidad de la semilla de mezquite colectada en el estado de Durango (pp. 145-149). En: Zúñiga, R., Vázquez, C., Silos, Ma. C., Fortis, M., Orona, I., Salazar, E (Eds.), *XXI Semana Internacional de Agronomía* (pp. 1-1045). Universidad Juárez del Estado de Durango.
- Minchala-Patiño, J., Poma-Angamarca, R., Muñoz-Chamba, L., Yaguana-Arévalo, M., González-Zaruma, D., Eras-Guamán, V. H., Rojas-Idrogo, C., Delgado-Paredes, G. E. (2014). Propagación *in vitro* de *Prosopis limensis* Benth. in Hook. (Fabaceae-Mimosoideae). *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales*, 22(1-2), 88-99.

- Muñoz-Gutiérrez, L., Ríos-Saucedo, J., García-García, D., Hernández-Pérez, C. (2022). Efecto del almacenamiento sobre la calidad fisiológica de semillas de *Prosopis laevigata* (H. & B.) Johnst. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 9(2), 1-7.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiolgy Plantarum*, 15, 473-497.
- Orozco-Cardona, A. F., Franco-Herrera, N., Taborda-Beltrán, L. A. (2010). Evaluación de tres métodos de escarificación en semillas de algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.). *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 20(1), 36-41.
- Palacios, A., Rodríguez, R., Hernández, Ma. de la L., Jiménez, E., Tirado, D. (2016). Distribución potencial de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston basada en un modelo de nicho ecológico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(34), 35-46.
- Palacios, R. A. (2006). Los Mezquites Mexicanos: Biodiversidad y Distribución Geográfica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41, 99-121.
- Peláez-Álvarez, A, Santos-Villalobos, S, Yépez, E., Parra-Cota, F. y Reyes-Rodríguez, R. (2016). Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50 ® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(6), 1401-1412.
- Pérez-Nasser, N., Martínez-Cruz, J., Lindig-Cisneros, R. (2019). *Manual de prácticas de propagación de especies nativas*. Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia.
- Pérez-Serrano, D., Gabirol, N., Martínez-Cervantes, C., Rojas-Oropeza, M. (20219). Mesquite management in the Mezquital Valley: A sustainability assessment based on the view point of the Hñähñú indigenous community. *Environmental and Sustainability Indicators*. 10, 1-12.
- Prieto, J. Á., Rosales, S., Sigala, J. Á., Madrid, R. E., Mejía, J. M. (2013). Producción de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl ex Wild.) MC Johnst. con diferentes mezclas de sustrato. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(20), 50-57.
- Quiñones, A., González, V., Chávez, J. R., Vargas, A., Barrientos, F. (2013). Evaluación de inoculantes promotores de crecimiento en la producción de plantas de mezquite [*Prosopis laevigata* (Humb. Et Bonpl. ex Willd.) MC Johnst.] en Durango. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(20), 42-80.
- Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana* 3:7–19.
- Rivera, J. C., Cabrera, R. M., Bulnes, F. (2020). Micropropagation of *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. Ex Willd.) Kunth from shoot tips. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 18-26.
- Rivas, G., Gonzales, G., Valencia, C., Sánchez I., Villanueva, J. (2005). Morfología y escarificación de la semilla de mezquite, huizache y ahuehuate. *Tecnología Pecuaria en México*, 43, 441–448.

- Ríos, J., López, J., Rosales, R., Trucíos R., Valles, A. (2011). Conservación y manejo de germoplasma de mezquite. En: Ríos, J., Trucíos R., Valenzuela, L., Sosa, G. & Rosales, R. (Eds.), *Importancia de las poblaciones de mezquite en el norte-centro de México* (1^{era} ed., N° 8., pp. 1-20). INIFAP.
- Ríos-Saucedo, J. C., Rosales-Serna, R., García-Rodríguez, J. L., Tracios-Caciano, R., Valenzuela-Núñez, L. M. (2012). Diagnóstico de reforestaciones de mezquite y métodos para incrementar su eficiencia en Durango, México. *Revista Forestal Baracoa*, 31(2), 35-40.
- Rodríguez, M., Chacón, M., Carrillo, R. (2014). Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 119-122.
- Rodríguez-Sauceda, E. N., Rojo-Martínez, G. E., Ramírez-Valverde, B., Martínez-Ruiz, R., Cong-Hermida, M. D., Medina-Torres, S. M., y Piña-Ruiz, H. H. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*, 10(3), 173-193.
- Rosales, R., Venezuela, L., Ríos, J., Jiménez, R., Ibarra, M. (2011). Diversidad genética en poblaciones naturales del Norte-Centro de México. En: Ríos, J., Trucíos R., Valenzuela, L., Sosa, G. & Rosales, R. (Eds.), *Importancia de las poblaciones de mezquite en el norte-centro de México* (1^{era} ed., N° 8., pp. 1-20). INIFAP.
- Sobrevilla-Solís, J. A., López-Herrera, M., López-Escamilla, A. L., Romero-Bautista, L. (2013). Evaluación de diferentes tratamientos pregerminativos y osmóticos en la germinación de semillas *Prosopis laevigata* (Humb. y Bonpl. Ex Willd) MC Johnston. *Estudios Científicos en el Estado de Hidalgo y Zonas Aledañas*, 2, 83-95.
- Tapia, A., Romero, A., Luque, V., Aybar, S., Nuñez, M. L., Allolio, P. (2012). Evaluación de distintos métodos de ruptura de la dormición en semillas de *Prosopis chilensis*. *Revista del CIZAS*, 12-13 (1-2), 55-61.
- Trucíos, R., Ríos, J., Estrada, J., Valenzuela, L. y Jacinto, R. (2011). Distribución espacial y cambio de uso de suelo en poblaciones naturales de mezquite. En: Ríos, J., Trucíos R., Valenzuela, L., Sosa, G., Rosales, R. (Eds.), *Importancia de las poblaciones de mezquite en el norte-centro de México* (1^{era} ed., N° 8., pp. 21-48). INIFAP.
- Utello, M., Tarico, J., Demaestri, M. y Plevich, J. (2023). Evaluación de tratamientos pregerminativos en semillas de *Prosopis caldenia*. *Bosque (Valdivia)*, 44(1), 37-45.
- Varela, S. A., Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Sistemas Forestales Integrados*, 3, 1-10.
- Viveros, H., Hernández, J. D., Velasco, M. V., Robles, R., Ruiz, C., Aparicio, A., Martínez, M. de J., Hernández, J., Hernández, M. L. (2015). Análisis de semillas, tratamientos pregerminativos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y su crecimiento inicial. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(30), 52-65.

- Villarreal, J. A., Rocha, A., Cárdenas-Ávila, M. L., Moreno, S., González Álvarez, M., Vargas, V. (2013). Caracterización morfométrica, viabilidad y germinación de semillas de mezquite y huizache en el noreste de México. *Phyton (Buenos Aires)*, 82(2), 169-174.
- Yépez, Florángel, & Arboleda, María Elena. (2009). Promoción de la emergencia en urape (*Bauhinia monandra* Kurz) y retama (*Thevetia peruviana* (Pers) Schum), especies potenciales para la arboricultura urbana. *Bioagro*, 21(1), 15-22.
- Zeberio, J., Pérez C. (2020). Tratamientos pregerminativos en especies leñosas del monte patagónico para su uso en la restauración ecológica. *Foresta Veracruzana*, 22(1), 11-16.